γ-射线及大肠杆菌诱导蓖麻蚕产生抗菌物质的研究*

戴祝英　张双全　　吴冬秀
（南京师范大学生物系，南京）（中国农业科学院蚕业研究所，镇江）

摘要　1. 用 γ-射线辐照和用大肠杆菌处理蓖麻蚕五龄幼虫和蚕蛹均能诱导血淋巴产生抗菌物质，两种诱导源诱导所得活性物质的抗菌活性相似。2. 研究了五龄幼虫期和蛹期诱导产生抗菌物质的动力学，发现五龄幼虫在饷食后第 2—4 天诱导活力最高，产生抗菌物质的持续时间亦较长；蛹期则从化蛹当天至第 4 天之间诱导活力较高，并可持续 15 天左右，高峰期一般在诱导后 2 天至 4 天之间。3. 对诱导后的蓖麻蚕血淋巴进行了电泳测活和葡聚糖凝胶初步分离，发现不论幼虫期或蛹期至少可得三个活性组分，其中既有类似于 P_5 的大分子抗菌物质，也有类似于 P_{9A} 和 P_{9B} 的抗菌多肽；并首次发现一种分子量约 70000—75000 道尔顿的新抗菌蛋白。

关键词　蓖麻蚕　抗菌物质　免疫诱导

已有不少报道说明昆虫体内具有特殊的防卫体系（Pye 等，1977；Wago 等，1982），不同的诱导源可以诱导同类昆虫产生类似的抗菌物质（屈贤铭等，1984），而不同昆虫诱导产生的抗菌物质则有很大差异（Hoffmann 等，1981；屈贤铭等，1984）。过去报道较多的为天蚕、柞蚕和家蚕等鳞翅目昆虫体内抗菌物质的诱导、分离和纯化。我们则以蓖麻蚕为主要研究对象，探明了 γ-射线和大肠杆菌诱导五龄幼虫和蛹产生抗菌物质的效果，研究了产生抗菌物质的动力学，并对诱导所得的抗菌物质进行了初步的分离和鉴定。

材 料 和 方 法

1. 供试蓖麻蚕品种　印白黄、素白蚕、684 等，由中国农业科学院蚕业研究所和广东省农科院蚕业研究所提供。

2. 大肠杆菌对蓖麻蚕和蛹的诱导及血淋巴的收集　不同品种的蓖麻蚕及蛹，每头注射 1×10^6 大肠杆菌数（*E. coli* D_{31}），置室温（25℃ 左右，相对湿度为 60—80% 左右）培育一定天数（一般为 3—7 天）后，采集血淋巴，10000 转/分 4℃ 离心 30 分钟，经玻璃纤维过滤，收集清液置 −30℃ 低温冰箱保存备用。

3. γ-射线处理　用钴源（^{60}Co）辐照，剂量为 3000—10000 伦琴，剂量率为 100 伦琴/分。

4. 免疫血淋巴的热处理　将免疫血淋巴上清液于 100℃ 沸水浴中加热 30 分钟，10000 转/分离心 30 分钟，吸出上清液，于沉淀中加入等体积的灭菌生理盐水溶解，再用

本文于 1986 年 11 月收到。
* 本文得到中国科学院上海生物化学研究所屈贤铭先生和许延森先生的指导和帮助；中国农业科学院蚕业研究所易文仲先生给予大力支持，沙巨姣、李森、徐新荣等同志参加部分试验工作。γ-射线辐照由江苏省农业科学院原子能利用研究所协助进行。在此一并致谢。

10,000 转/分离心 30 分钟,合并两次收集的上清液,于—30℃低温冰箱中保存备用。

5. 抗菌物质的分离及活性测定 酸性聚丙烯酰胺凝胶电泳法和葡聚糖凝胶层析法以及培养皿测活法参看 Hultmark 等(1982)的报道。碱性电泳的凝胶浓度为 10%,pH8.9,Tris-Gly 缓冲系统。

6. 大分子抗菌物质的纯化及分子量测定 碱性电泳后将对 *E. coli* 具有抗菌活性的凝胶电泳区带切下磨碎,用 pH7.2 的 0.01mol/L 磷酸缓冲液低温抽提 6 小时,10000 转/分离心 30 分钟,上清液冻干后鉴定。分子量测定用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法,凝胶浓度为 10%,Tris-Gly 缓冲系统连续电泳,电泳条件见 Qu 等(1982)。

结 果

一、γ-射线和大肠杆菌诱导蓖麻蚕和蛹产生抗菌物质的动力学变化

γ-射线和大肠杆菌都能诱导蓖麻蚕产生抗菌物质,由于诱导源不同,诱导产生抗菌物质的动力学也各有差异,分述如下:

1. 不同剂量的 γ-射线诱导蓖麻蚕蛹后产生抗菌物质的动力学比较:经用 3000γ(伦琴,下同)、5000γ、8000γ 和 10000γ 等不同剂量的 γ-射线照射化蛹 2 天的蓖麻蚕蛹(剂量率均为 100γ/分),取相同性别的蚕蛹(全为♀性),在无菌操作条件下,每隔一天从同一头蛹的头部一侧取 1—2 滴血淋巴(立即贮存于—30℃的低温冰箱中),用液状石蜡封住伤口,10 天后同时测定抗菌活力,结果见图 1。由图 1 可见,正常对照蚕蛹的血淋巴始终测不出抗菌活性,而 3000γ 辐照组于照射后第五天出现了活力高峰,以后活力下降;5000γ 组的抗菌活性变化规律与 3000γ 组相仿,但下降速度稍缓;8000γ 组则自第五天起抑菌活力逐渐上升,直至第九天才出现最高峰;而 10000γ 组在辐照后第二天就出现了活力高峰,但持续时间亦最短。综观以上结果可以看出,高剂量 γ-射线诱导后血淋巴中抗菌物质出现早,并很快达到高峰,以后迅速下降;稍低剂量诱导则血淋巴中抗菌物质出现较迟,持续时间亦较长。在本试验范围内,以 8000γ 为最佳诱导剂量。

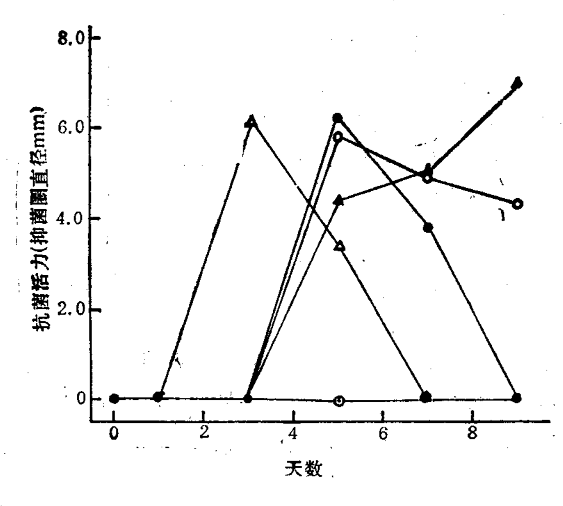


图 1 不同剂量 γ-射线诱导蓖麻蚕蛹产生抗菌物质的比较
(供试品种:素白蚕)
⊙——⊙正常对照 ●——●3000γ ○——○5000γ
▲——▲8000γ △——△10000γ

2. 用大肠杆菌诱导蓖麻蚕和蛹产生抗菌物质的动力学研究:以往多数报道中,均以滞育蛹或刚化蛹的嫩蛹进行诱导,这就使得工作时间相对集中,供试材料亦受一定限制。我们对蓖麻蚕五龄幼虫和不同发育天数的蓖麻蚕蛹分别以大肠杆菌 D_{31} 诱导,以比较其产生抗菌物质的差异,结果如图 2、3 所示。图 2 为大肠杆菌诱导不同天数的五龄幼虫后产生抗菌物质的动力学。可以看出,自五龄起蚕至第 6 天均能诱导产生抗菌物质,其中以第 2—4 天为诱导最佳时期,抑菌

圈直径约为 8—10 毫米左右，最高可达 12 毫米，过早或过迟则诱导效果均差。图 3 为大肠杆菌诱导蓖麻蚕蛹产生抗菌物质的动力学。图中曲线表明，自化蛹当天到化蛹后 4 天进行诱导，均能得到活性较高的抗菌物质，其中化蛹当天（嫩蛹）诱导，抗菌物质的活力高峰出现于诱导后第 4 天，之后虽逐渐下降，但下降速度较缓慢，一直维持到第 14 天仍有相当高的活力。化蛹后 1—4 天诱导产生抗菌物质的速率较快，活力高峰一般出现在诱导后的 2—3 天，以后的变化与嫩蛹诱导基本相似。此结果给予我们这样一个启示，即蛹期诱导不一定限于嫩蛹，这就更有利于工作的合理安排和材料的充分利用。

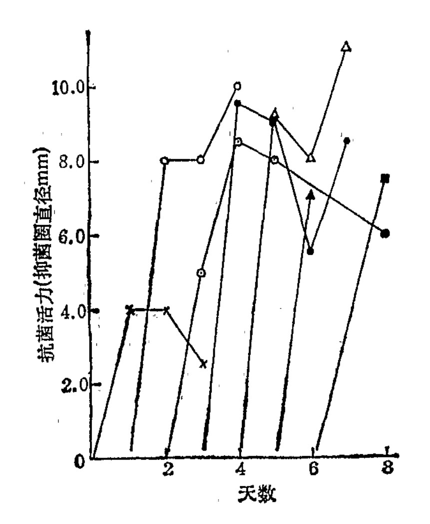


图 2　大肠杆菌诱导蓖麻蚕五龄幼虫产生抗菌物质的动力学变化（品种：印白黄）
×——×五龄起蚕　○——○五龄一足天　⊙——⊙五龄二足天　●——●五龄三足天　△——△五龄四足天　▲——▲五龄五足天　■——■五龄六足天

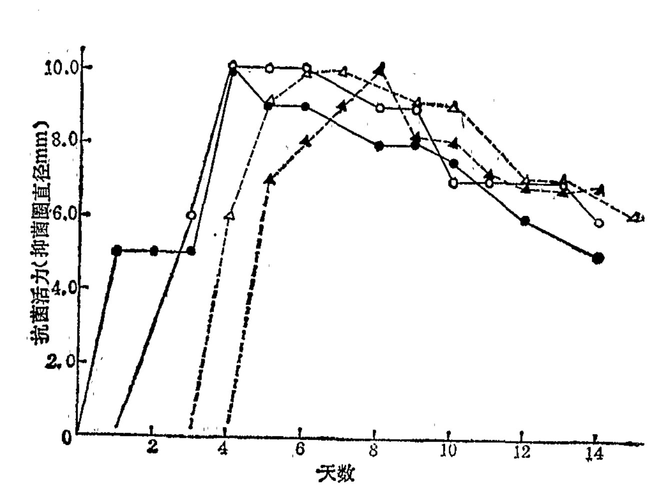


图 3　大肠杆菌诱导蓖麻蚕蛹产生抗菌物质的动力学变化（品种：印白黄）
●——●化蛹当天　△——△化蛹后三天
○——○化蛹后一天　▲——▲化蛹后四天

二、大肠杆菌诱导蓖麻蚕蛹产生抗菌物质的组分鉴定

屈贤铭等（1984）曾报道，用超声波和大肠杆菌诱导蓖麻蚕只产生一种活性组分。但从我们的试验结果来看，用大肠杆菌诱导后的蓖麻蚕蛹血淋巴，用酸性电泳的方法至少可分得三个活性组分，其中迁移最慢的大分子抗菌物质的位置类似于柞蚕中的 P_5，另两个迁移较快的组分别类似于 P_{9A} 和 P_{9B} 的位置，属小分子抗菌多肽（见图 4）。另外，我们还用碱性电泳的方法首次分得一个具有抗菌活性的新组分，用 SDS-PAGE 测得分子量为 70000—75000 道尔顿（图 4C）。若用诱导后的新鲜血淋巴进行电泳测活，则主要活性组分为大分子物质（见图 4B），若将血淋巴置于－20℃——30℃的低温冰箱内保存 2—3 个月后再行测活，则发现同一血淋巴样品中出现了小分子活性物质（图 4A）。这一现象我们仅在 684 品种中发现，其余品种主要还是大分子抗菌物质。此结果用培养皿测活法也得到了证实（见图 5）。图 5 表明，5、6 中存在小分子活性物质，而 3 中则不存在。以上结果提示我们，在大分子和小分子抗菌物质之间似乎存在着某种密切的关系，这一发人深思的现象将有必要进行深入一步的研究。

三、蓖麻蚕蛹血淋巴内抗菌物质的初步分离纯化和鉴定

收集大肠杆菌诱导后的蓖麻蚕蛹免疫血淋巴，冷冻一段时间后，经低温高速离心并过滤，吸取 20 毫升，上事先用 0.15mol/L pH 5.3 NH_4Ac 缓冲液(含 0.1% 的苯基硫脲)平衡好的 Sephadex G-100 柱，然后用相同的缓冲液洗脱，分离。所得各管用 751 型紫外分光光度计测定 280nm 处的吸收值，同时进行培养皿测活，结果见图 6。图 6 表明有 3 个抗菌活力的吸收峰，与电泳测活图谱完全一致。为了鉴定这 3 个活性组分是大分子还是小分子物质，我们另用同批免疫血淋巴经热处理后，取 30 毫升上清液，上用 0.05mol/L 乙酸铵(pH 5.1)平衡后的 CM-Sepharose CL-6B 柱 (25 × 0.55cm)，然后以 0.05 mol/L 对 0.4mol/L 及 0.4 mol/L 对 1 mol/L 乙酸铵(pH5.1)梯度洗脱，结果见图 7。图 7 显示，经热处理后尚能分得对热稳定的 3 个小分子活性组分，我们分别称之为 α、β 和 γ，其中 α 组分对阳离子交换剂的吸附能力较低，有可能为一偏酸性物质，而 β 和 γ 则可能类似于 P_{9A} 和 P_{9B}。

A　B　C

图 4　蓖麻蚕蛹免疫血淋巴中的活性组分
(品种：684)
A. 诱导后的免疫血淋巴于低温冰箱中存放两个月后的酸性电泳测活图（显示三个活性组分） B. 新鲜的免疫血淋巴酸性电泳测活图（一个活性组分） C. 碱性 PAGE 分离和鉴定的大分子抗菌活性物质

图 5　热处理对存放不同时间的蓖麻蚕免疫血淋巴抑菌活力的影响(品种：684)
1. 对照　2. 未经煮沸的新鲜免疫血淋巴的抑菌圈　3. 煮沸后的新鲜免疫血淋巴（不表现抗菌活性）　4. −30℃中存放 2 个月后的免疫血淋巴(未经煮沸)　5. −30℃中存放 1 个月的免疫血淋巴(煮沸 30 分钟)　6. −30℃中存放 2 个月后的免疫血淋巴(煮沸 30 分钟)

除了酸性电泳测得三个活性组分外，我们还用碱性 PAGE 首次分得一个新的抗菌活性组分，该组分 pI 偏低，在酸性聚丙烯酰胺凝胶电泳中不出现。将碱性电泳制备得到的新的抗菌组分冻干后，先经培养皿测活，再以上海生化所东风厂生产的低分子量标准蛋白为标准样品，用 SDS-PAGE 测定分子量，结果见图 8、9。其主带分子量约为 70000—75000 道尔顿。这一新的抗菌活性组分的进一步分离、纯化和鉴定工作正在进行中。

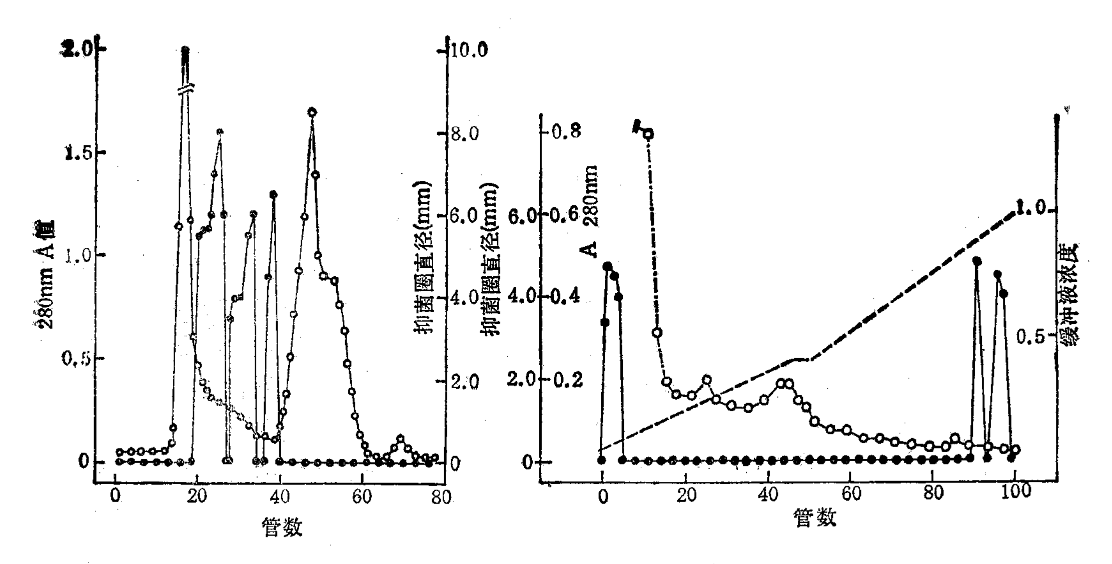


图 6　大肠杆菌诱导蓖麻蚕蛹血淋巴在 Sephadex-G-100 柱上的层析行为(品种：684)
○——○ 280nm 吸收值　●——●抗菌活力

图 7　热处理后的蓖麻蚕蛹血淋巴在 CM-Sepharose CL-6B 柱上的纯化(品种：684)
○——○ 280nm 吸收值　●——●抗菌活力

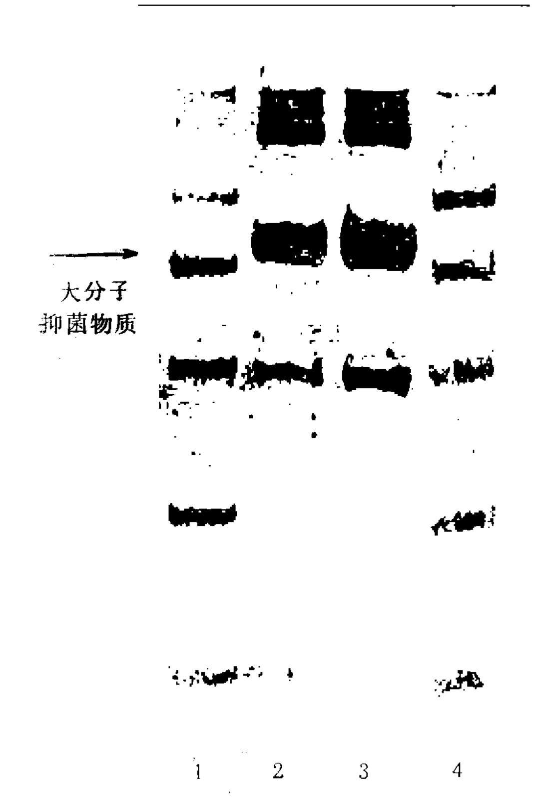


图 8　蓖麻蚕蛹免疫血淋巴碱性电泳初步分离制备的抗菌物质 SDS-PAGE 图谱(品种 684)
1、4 孔为标准蛋白样品　2、3孔为初步分离的新抗菌物质，箭头所示为新发现的大分子抑菌物质

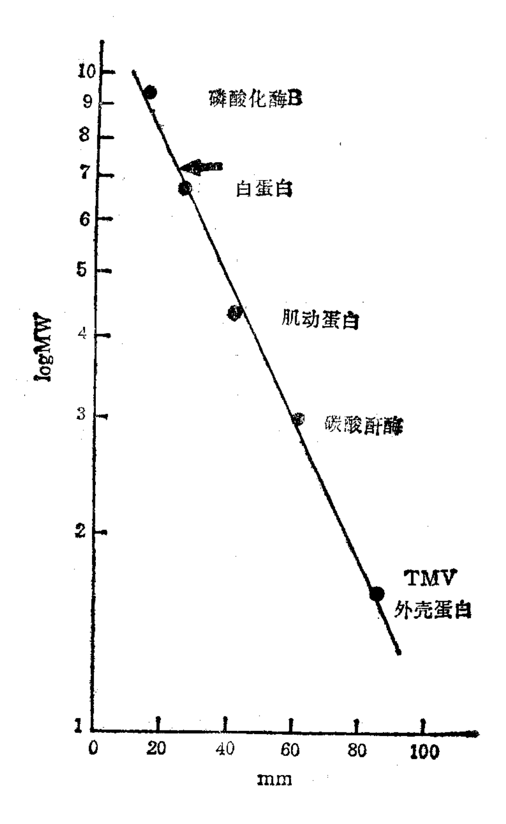


图 9　蓖麻蚕蛹免疫血淋巴碱性 PAGE 抗菌物质的分子量测定
●表示标准样品：磷酸化酶 B(94000)　白蛋白(67000)肌动蛋白 (43000)　碳酸酐酶 (30000)　TMV 外壳蛋白(17500)　←示样品所在位置

讨 论

多种理化因素处理鳞翅目昆虫都能诱导血淋巴产生抗菌物质（Hoffmann 等，1981；祁国荣等，1983；屈贤铭等，1984）。不同诱导源对同一种昆虫以及同一诱导源对不同种昆虫诱导所得的抗菌物质差异甚大，这可能与各种昆虫的系统发育和进化有关（Xian-ming Qu 等，1982）。本文所述用 γ-射线和大肠杆菌都能诱导蓖麻蚕产生抗菌物质，所得活性组分与天蚕、家蚕和柞蚕都不尽相同。曾有报道认为大肠杆菌或超声波诱导蓖麻蚕蛹后从酸性电泳中只看到一个分子量较大的活性组分（屈贤铭等，1984），我们经多次重复试验后认为至少可得 3 个活性组分，除有一个类似于 P_5 位置的大分子活性物质（经 SDS-PAGE 测定分子量约为 24000 道尔顿）外，还有 2—3 个小分子活性物质。电泳图谱上一般只看到 3 个活性组分，但煮沸后的血淋巴经 CM-Sepharose CL-6B 柱分离后仍出现三个活性峰（图 8 α、β、γ），可能由于 β 和 γ 两个峰的多肽其分子量和所带电荷差异不大，或是其中之一含量较低之故，因而电泳图上不易分开和显示。另外，我们用碱性电泳还分得一个以前未见报道过的分子量为 70000—75000 道尔顿的大分子抗菌物质，该组分与 P_5 或其他小分子抗菌物质的关系正在进一步研究中。

本试验的结果还指出，用大肠杆菌诱导蓖麻蚕后，收集的血淋巴由于低温存放时间长短不同，电泳测活所示活性组分也有差异，新鲜血淋巴往往只出现 1—2 个分子量较大的活性组分，经热处理后，活性完全丧失，而低温（—30℃）保存 2—3 个月后的血淋巴便出现了明显的小分子活性物质（见图 5）。张双全等（1985）曾报道用金属络合剂与大肠杆菌混合诱导柞蚕蛹能影响抗菌物质组分比例的变化，随着时间的推移，大分子抗菌物质的量逐渐减少，而小分子抗菌物质的量逐渐增多。我们的结果与之有某些相似之处，因此是否可以设想，大分子抗菌物质和小分子抗菌肽之间是否有可能存在前体和产物的关系。

另外，关于诱导时期和诱导手段的探讨，我们也从实际应用的角度做了一些尝试。从本试验结果看，诱导时期并非一定限于滞育蛹和嫩蛹，末龄幼虫期和整个前蛹期均为最适诱导期。诱导手段除了用大肠杆菌、聚肌胞苷或超声波等理化因素外，我们以 γ-射线辐照亦能产生抗菌物质，这不仅是增加了一种诱导手段的问题，也许有可能为今后大量诱导和分离抗菌物质提供一种可行的方法。

参 考 文 献

屈贤铭、祁国荣、黄自然 1984 注射大肠杆菌或超声波诱导蚕体及蓖麻蚕产生抗菌物质的比较研究。昆虫学报 27(3): 268—72。

祁国荣、周奇、屈贤铭、黄自然 1983 超声波诱导柞蚕血淋巴产生抗菌物质。科学通报 28(10): 622—4。

张双全、屈贤铭、戚正武 1985 不同诱导源对柞蚕血淋巴及生殖腺中抗菌物质产生的影响。生物化学杂志 1(4): 49—56

Hoffmann, D. Hultmark, D. & Boman, H. G. 1981 Insect Immunity: *Galleria mellonella* and other Lepidoptera have cecropinlike factors active against gram-negetive becteria. *Insect Biochemistry* 11(5): 537—48.

Hultmark, D. Engstrom, A. Bennich, H. Kapur, R. & Boman, H. G. 1982 Insect Immunity: Isolation and structure of cecropin D and four minor antibacterial components from *Cecropia* pupae. Eur. *J. Biochem.* 127: 207—17.

Pye, A. E. & Boman, H. G. 1977 Insect Immunity III, Purification and partial characteriazation of immune protein P5 from haemolymph of *Hyalophora cecropia*. *Insect Immunity* 17(2) 408—14.

Wago, H. 1982 Cellular recognition of foreign materials by *Bombyx mori* phagocytes I. Immunocompetent cells.

Dev. Comp. Immunolog. 6: 591.

Xian-ming Qu et. al. 1982 Insect Immunity: Isolation and structure of cecropins B and D from pupae of the Chinese oak silk moth, *Antheraea pernyi*, Eur. J. Biochem. 127: 219—24.

STUDIES ON THE ANTIBACTERIAL SUBSTANCES OF *PHILOSAMIA CYNTHIA RICINI* INDUCED BY γ-RADIATION AND *ESCHERICHIA COLI*

DAI ZHU-YING ZHANG SHUANG-QUAN

(*Department of Biology, Nanjing Normal University, Nanjing*)

WU DONG-XIU

(*Institute of Sericulture, Academy of Agricultural Sciences of China, Zhenjiang*)

Both the larvae in fifth instar and the pupae of *Philosamia cynthia ricini* can be induced to produce antibacterial substances in the haemolymph by irradiation with γ-rays or injection with *Escherichia coli*. The antibacterial activities of the active substances induced by these two factors are similar. It was found that the most competent stage of the insect for the induction was two to four days after starting the feeding in fifth larval instar and the duration of the competence was about three to six days. In the pupal stage the most competent stage was from the first to the fourth day after the last larval moult which could last for about 15 days. In general the peak of the immunological reaction was in the period of two to four days after the treatment.

The antibacterial substances in the haemolymph of the larvae and pupae induced by injection with *E. coli* was studied by electrophoresis (PAGE) and isolated with sephadex and sephrose. It was found that at least three active components could be obtained and they included a P_5-like large molecule and a P_{9B}-like polypeptide in both the larval and pupal stages. A new antibacterial protein with MW about 70,000-75,000 dalton was found.

Key words *Philosamia cynthia ricini*——antibacterial substance——immunological induction